

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung DE 101 36 009.6 über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

101 36 009.6

Anmeldetag:

24. Juli 2001

Anmelder/Inhaber:

Professor Dr. Hans Konrad
Müller-Hermlink, 97082 Würzburg/DE;
Professor Dr. Heinz Vollmers,
97084 Würzburg/DE; Dr. Frank Hensel,
97070 Würzburg/DE.

Bezeichnung:

Rezeptor, dessen Verwendung sowie Mausantikörper

IPC:

C 07 K 16/00, C 07 K 14/435, A 61 K 38/17,
A 61 K 30/395, A 61 K 49/00, C 12 Q 1/68,
G 01 N 33/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der Teile der am 24. Juli 2001 eingereichten Unterlagen dieser Patentanmeldung unabhängig von gegebenenfalls durch das Kopierverfahren bedingten Farbabweichungen.

München, den 26. Januar 2007
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Brosig

Rezeptor, dessen Verwendung sowie Mausantikörper

5 Die Erfindung bezieht sich auf einen an der Oberfläche von stark proliferierenden Zellen insbesondere des Magenkarzinoms befindlichen Rezeptor, dessen Verwendung, sowie die Struktur eines spezifisch hieran bindenden Mausantikörpers.

10 Weithin bekannt ist, für klinische und wissenschaftliche Untersuchungen von Hybridomen erzeugte monoklonale Antikörper einzusetzen. Für die Behandlung von Tumoren, viralen und mikrobiellen Infektionen, B-Zell-Immundefizienzen mit verringerter Antikörpererzeugung und andere Störungen des Immunsystems ist die Anwendung humaner monoklonaler, von B-Zell Hybridomen erzeugter Antikörper vielversprechend.

20 Beim Magenkarzinom handelt es sich um eine der weltweit häufigsten Krebsarten. Nach Lauren „The two histological man types of gastric carcinoma“, Acta Path Microbiol Scand; 64:331-49, werden sie histologisch eingeteilt in diffuse Adenokarzinome und intestinale Adenokarzinome. Intestinale Magenkarzinome sind oft von chronischer Gastritis B begleitet und insbesondere von intestinalen Metaplasien, die als Vorläufer dysplastischer Veränderungen und von Magenkarzinomen betrachtet werden. Unterschiede zwischen diesen

25 beiden Arten zeigen sich auch darin, dass Patienten mit Karzinomen des diffusen Typs oft der Blutgruppe A angehören, woraus auf den Einfluss genetischer Faktoren beim Krebsrisiko geschlossen werden kann, während Umweltfaktoren, z.B. eine Helicobacter pylori-Infektion, möglicherweise für die Entstehung von Karzinomen des intestinalen

30 Typs von Bedeutung sind. Zwar ist eine abnehmende Häufigkeit der Magenadenokarzinome im Westen festzustellen, dafür treten sie aber nun vermehrt im Osten auf.

Die Entwicklung von Magenkrebs ist ein mehrstufiger und multifaktorieller Prozeß (Correa, 1992 Cancer Res. 52:6735-6740). Obwohl nur wenig über die molekularen Mechanismen bekannt gelten als Faktoren hohe Salzeinnahmen, Alkohol, Nitrosamine und Infektionen mit dem Bakterium *Helicobacter Pylori* (*H. pylori*) als nachweislich am Entstehen des Magenkrebses beteiligt. Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen *H. pylori* Infektionen und dem Vorkommen von Gastritis dysplasi und der Entwicklung von Magenkrebs wurde dieses Bakterium durch die WHO als in die Klasse 1 der kanzerogenen Stoffe gehörend klassifiziert. *H. pylori* induziert direkt schwerwiegende vorkanzerogene Änderungen der Zellen im Bereich der Schleimhaut und ist ebenfalls verantwortlich für ein Ansteigen der Autoantikörper, die häufig bei Gastritis und Magenkrebspatienten beobachtet werden (Negrini et al., 1996 Gastroenterol. 111:655-665). Diese Antikörper sind in der Lage, Magenlasionen und Apoptose im Magenepithel zu induzieren (Steiniger et al., 1998 Virchows Arch. 433:13-18). Die Natur der Antigene ist teilweise bis heute unbekannt. Antikörper gegen die Magen H⁺/K⁺-ATPase (Claeys et al., 1998 Gastroenterology 115:340-347), Interleukin-8 (Crabtree et al., 1993 Scand.J.Immunol. 37:65-70; Ma et al., 1994 Scand.J.Gastroenterol. 29:961-965) und das Lewisblutgruppenantigen (Appelmek et al., 1997 Trends.Microbiol. 5:70-73) werden häufig bei Magenschleimhaut oder Magenkrebs gefunden.

Die Therapie war bislang auf Gastrektomie und Lymphadenektomie beschränkt, aufgrund der auch dann noch schlechten Prognose besteht jedoch der Bedarf nach einer neuen begleitenden Therapie. Immunologische Studien haben gezeigt, dass auch in Fällen, in denen das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann, eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar ist, aber nicht ausreicht, um die Tumorzellen zu zerstören. Ein wirkungsvoller An-

5 satz ist nun der, von der Immunantwort des Patienten stammenden Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und therapeutisch einzusetzen. So wurden bsp. von Patienten mit Lungen-, Ösophagus- und Dickdarmkrebs stammende Antikörper isoliert und davon humane monoklonale Antikörper abgeleitet, die z.B. direkt Differenzierung und das Wachstum der Tumorzellen beeinflussen.

10 Apoptose ist der programmierte Zelltod, Selbstmord von Zellen, durch Fragmentation der DNA, Zellschrumpfung und Dilatation des endoplasmatischen Reticulums, gefolgt von Zellfragmentation und der Bildung von Membranvesikeln, den sog. apoptotischen Körpern. Apoptose, die physiologische Form des Zelltods, garantiert eine schnelle und saubere Entfernung unnötiger Zellen, ohne Entzündungsvorgänge oder Gewebeverletzungen auszulösen wie im Falle der Nekrose. Unter pathologischen Bedingungen dient sie auch zum Entfernen maligner Zellen, wie etwa Krebsvorläuferzellen. Sie kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden, wie etwa durch zytotoxische T-Lymphozyten oder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor, Glukokortikoide und Antikörper. Sie ist die häufigste Todesursache eukaryontischer Zellen und kommt vor in der Embryogenese, Metamorphose und Gewebsatrophie. Apoptotische Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie jene der NGF/TNF-Familie werden prädominant auf Lymphozyten exprimiert, befinden sich aber auch auf verschiedenen anderen Zelltypen, weshalb sie sich nicht für eine Krebstherapie eignen. Insbesondere haben bei in-vivo-Tests Liganden und Antikörper für diese Rezeptoren zu Leberschäden geführt. Deshalb sind tumorspezifische Rezeptoren mit apoptotischer Funktion besonders wichtig.

30 In jüngsten Publikationen wurde der humane Antikörper 103/51 beschrieben, der von Magenkrebspatienten mit diffusem Adenokarzinom gewonnen wurde und der mit H. pylori und Magenkrebszellen

wechselwirkt (Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532). Bei allen Untersuchungen wurde die bekannte Magenadenokarzinom-Zelllinie 23132 verwendet, die unter der Nr. ACC201 bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig hinterlegt ist. Der Antikörper hat in geringen Dosen einen mitotischen Effekt auf Magenkrebszellen in vitro, in dem sie an einen 130 kD Membranrezeptor binden (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235). Durch Sequenzierung der Genbereiche des Antikörpers wurde der Antikörper 103/51 als Autoantikörper identifiziert. Immunohistochemische Untersuchungen zeigen, daß der Antikörper stark mit Magenkrebszellen und mit Magen-

hormonzellen reagiert.

Der zelluläre Rezeptor des monoklonalen Antikörpers 103/51 war bisher nicht bekannt. Im Rahmen der zu vorliegenden Erfindung führenden Untersuchungen konnte dieser zelluläre Rezeptor identifiziert werden. Diese Identifizierung gestaltete sich jedoch als schwierig. Einerseits reagiert der monoklonale Antikörper 103/51 bei der Westernblot-Analyse mit seinem Rezeptor nur unter ganz bestimmten Stringenzbedingungen. Andererseits findet man eine durch Denaturierungsartefakte hervorgerufene unspezifische Reaktion mit einer Reihe weiterer Proteine.

Sequenzierungen haben gezeigt, daß der Rezeptor Übereinstimmungen mit dem CFR-1 Protein aufweist, jedoch mit diesem nicht identisch ist. Des weiteren werden damit Glycoprotein-Verbindungen beansprucht, die in einer oder mehreren Determinanten (Liganden) mit denen des bekannten CFR-1 übereinstimmen. Insbesondere wird eine Homologie gefordert, die im Sinne dieser Anmeldung als eine Übereinstimmung von mindestens 80% in den primären Aminosäuresequenzen zu definieren ist. Der Rezeptor ist demzufolge eine Isoform zu CFR-1. Zusätzlich ist eine spezifische Bindung entweder

an den humanen Antikörper 103/51 und/oder den murinen Antikörper 58/47-69 gefordert.

5 In spezieller Ausgestaltung weist das CFR-1 Protein als Determinante eine Aminosäuresequenz gemäß Anlage S Zelllinie 23132 auf.

Bei dem zellulären Rezeptor des Antikörpers 103/51 handelt es sich um eine für Tumorzellen, insbesondere für Magenkarzinomzellen spezifische Isoform des Proteins CFR-1, die in normalen Gewebe nicht auftritt. Die spezifischen Rezeptoreigenschaften dieser Isoform beruhen auf einer besonderen mit dem Proteinrückgrat über eine N-Verknüpfung verbundenen Glykostruktur. Die tumorspezifische Rezeptor kann in einem Screeningverfahren zur Identifizierung von spezifischen Bindepartnern eingesetzt werden. Spezifischer Bindepartner an den Rezeptor sind im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Substanzen, die selektiv an eine tumorspezifische Glykostruktur von CFR-1 binden und vorzugsweise die Fähigkeit zur Apoptoseinduzierung besitzen. Diese spezifischen Bindepartner können für die Herstellung von therapeutischen Mitteln zur Tumorbekämpfung sowie zur Herstellung von diagnostischen Mitteln eingesetzt werden.

Die Proteinverbindung wurde als Isoform des CFR-1 durch Reinigung, Sequenzierung und Transfektion bestimmt. Die Spezifität für das Antigen 103/51 wird durch Herstellung muriner Antikörper aus gereinigten Molekülen mit identischen Reaktionen und Funktionen bestätigt, durch immunhistochemisches Färben und einer MTT-Untersuchung von zwei CFR-1 negativen Zelllinien. Die Isoform des CFR-1 Moleküls, welches sowohl durch den humanen als auch den murinen Antikörper festgestellt wurde, ist in den Zellmembranen der Epithelzellen lokalisiert und hat ein Expressionsmuster, das sich von

den bisher für CFR-1 beschriebenen unterscheidet (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609).

5 Das CFR-1, welches aus hochaffinen FGF Bindeprotein
(FGF=fibroblast growth factor) aus Hühnerfibroblasten isoliert wurde
(Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609), bindet in einer grö-
ßeren Anzahl an FGFs und dürfte eine Rolle spielen bei der Regulie-
rung der Zellproliferation. In Eizellen chinesischer Hamster (CHO)
wurde CFR-1 im Golgi-Apparat (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol.
10 12:5600-5609) gefunden, aber es kann ebenso in einer mutierten
Form ausgeschieden werden (Zuber et al. 1997 J.Cell Physiol.
170:217-227). In Abhängigkeit vom Organismus wurden zwei Vari-
anten des CFR-1 festgestellt, die Homologien zwischen 80 und 95%
mit ESL-1 (= E-selectin-ligand 1) und MG-160 (Membransialoglyko-
15 protein 160) aufweisen (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-
5609; Stieber et al., 1995 Exp.Cell.Res. 219:562-570; Steegmaier et
al., 1995 Nature 373:615-620; Mourelatos et al., 1996 DNA Cell.Biol.
15:1121-1128) und scheinen keine weiteren Sequenzhomologien mit
anderen, soweit bekannten Proteinen aufzuweisen. Die Funktion und
20 der zelluläre Aufbau der CFR-1 und deren Homologen ist relativ un-
bekannt und widersprüchlich. Es konnte gezeigt werden, daß MG-
160, welches ein mittleres Golgi sialoglycoprotein dargestellt und aus
Rattenhirn gewonnen wurde, eine Rolle im intrazellulären FGF Aus-
tausch spielt (Zuber et al., 1997 J.Cell.Physiol. 170:217-227).

25 Jüngste Resultate haben gezeigt, daß die Lokalisierung dieses Pro-
teins nicht auf den Golgi Apparat beschränkt ist. Dann jedoch, wenn
es am c-terminus abgeschnitten ist, kann das Protein an der Plas-
mamembran und den Filopodia lokalisiert sein (Gonatas et al., 1998
30 J.Cell.Sci. 111:249-260). Dies stimmt überein mit der Kenntnis, daß
das dritte Homologe, ESL-1, welches aus mausneutrophilen Proge-
nitorzellen isoliert wurde (32Dcl3), sowohl im Golgi-Apparat als auch

an der Zelloberfläche von microvilli gefunden wurde (Steegmaier et al., 1997 J.Cell.Sci. 110:687-694; Gonatas et al., 1998 J.Cell.Sci. 111:249-260). ESL-1 wurde als Ligand von E-selectin in neutrophilen Zellen mit einem ungefähren Molekulargewicht von 150 kD identifiziert. Immunpräzipitation mit Anti ESL-1 Antikörpern zeigen, daß eine nicht näher definierte Isoform dieses Proteins aus verschiedenen Zellen ausgefällt werden können, einschließlich einiger Krebszelllinien (Steegmaier et al., 1995 Nature 373:615-620).

Aufgrund der überwiegend in den Membranen von Krebszellen liegenden Vorkommen des CFR-1, ist der Schluß zu ziehen, daß der beschriebene Rezeptor eine Isoform des CFR-1 ist. Eine abweichende Zellverteilung von CFR-1 und seiner Homologe ist wahrscheinlich für die oben genannten Resultate verantwortlich und ist ein bekanntes Phänomen für andere Proteine (Smalheiser, 1996 Mol.Biol.Cell 7:1003-1014). Eine abweichende Verteilung kann durch ein abweichendes Glycosilierungsmuster in malignen Zellen verursacht werden, die zu einem Transport zu den Plasmamembranen führen.

Die Gewebeverteilung zeigt, daß das CFR-1 Molekül mit aktivierten und proliferierenden Zellen in Verbindung steht, wie durch Anfärben mit dem Antikörper Ki67 gezeigt wurde (Ramires et al., 1997 J.Pathol 182:62-67). Die normale Magenschleimhaut zeigt diesen Rezeptor nicht in meßbarem Umfang, aber die mit H. pylori infiltrierte Epithelien oder displastische Epithelien weisen dieses Antigen auf. Beide Gewebe sind proliferativ und können Vorgänge für den Magenkrebs sein.

Für das Verständnis der hohen Wirksamkeit entscheidend ist, daß sich im Gegensatz zur Struktur des CFR-1, die sich auch auf gesunden Zellen findet, die ermittelte Isoform sich nicht auf gesunden sondern ausschließlich auf stark proliferierenden Zellen findet, Zellen

also, die sich stark teilen, wie beispielsweise die im Wachstum befindlichen Tumorzellen sowie entsprechender Vorläuferstufen. Die Wirkungsweise des Rezeptors beruht im wesentlichen darauf, daß er als Energierezeptor der Nahrungsaufnahme der Zellen dient und insbesondere bei Zellen mit häufiger Teilung, zu denen die Karzinomzellen zählen, einen dominierenden Anteil aufweisen. Ausdrücklich anzumerken ist, daß dieser Rezeptor nicht nur bei Magenkarzinomen Anwendung finden wird, sondern auch bei allen epithelialen Tumoren, die im wesentlichen gleiche Reaktionsmechanismen aufweisen. Hinausgehend über Magentumore wurde die Existenz dieser Rezeptoren in kanzerogenen Gewebe folgender Tumore nachgewiesen: Darm, Speiseröhre, Rektum, Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Vater-Gefäße, Lunge, Bronchien und/oder Brust. Die tumorwirksamen Antikörper, die an den erfindungsgemäßen Rezeptor andocken, wirken also gezielt wirksam an den kanzerogenen (und nicht den gesunden) Zellen.

Die Glycoproteine der Rezeptorstruktur können über deren Molekulargewicht von etwa 130 kD identifiziert werden, wobei sich das Molekulargewicht in einer der bekannten Weise, so z. B. mittels der Gelelektrophorese ermittelt werden kann. Der Begriff „etwa“ bezieht sich darauf, daß für einen Fachmann erkennbar ist, daß derartige Größenbestimmungen keinesfalls exakt sind, sondern Veränderungen oder Variationen der Methoden der Molekulargrößenbestimmungen zu Schwankungen in der Meßwerten führen.

Das bedeutendste Anwendungsgebiet des Rezeptors ist das der Diagnose und Therapie. Bei der prophylaktischen Anwendung wird der Rezeptor dem Patienten in pharmazeutischen Dosen verabreicht, mit dem Ziel der Stimulierung von Antikörpern, so daß sich im Ergebnis eine Vaccinierung mit Hilfe des Rezeptors erreichen läßt. Die

Antikörper tragen Sorge dafür, etwaig entstehende Tumorzellen zu beseitigen.

5 Aber auch die Verabreichung des Rezeptors bei bereits vorhandenen Tumorzellen ist eine Möglichkeit der Medikation. Die verabreichten Rezeptoren unterstützen und verstärken die Antikörperbildung und sorgen folglich für eine erhöhte Apoptose der Tumorzellen oder für eine komplementvermittelte Lyse. Die Zelle „verhungert“, da eine Blockierung des Rezeptors zu einem Wachstumsstillstand führt.

10 Die Verwendung des Rezeptors zu Diagnosezwecke nutzt die Binde-fähigkeit der Antikörper an diesem Rezeptor aufgrund der spezifischen Antigen/Antikörper-Wechselwirkung. Auf diese Weise lässt sich über die Bindungsfähigkeit an den Rezeptor ein Nachweis für die Existenz, die Lokalisierung und/oder die Menge der entsprechenden Antikörper führen. Nach den gleichen Reaktionsmechanismen ist über die Binde-fähigkeit ein Nachweis des Rezeptors möglich.

15 Insbesondere dann, wenn die Antikörper Tumorantikörper sind, können sie zum Nachweis für die Existenz von Tumoren genutzt werden. Insbesondere ist es möglich, den Rezeptor als Tumormarker zu nutzen.

20 In einer Weiterbildung kann der Rezeptor zur Herstellung eines Antitumormittels genutzt werden, in dem potentiell antitumorwirksame Substanzen auf ihre spezifische Binde-fähigkeit an den Rezeptor untersucht werden und bei positiven Ergebnis, d.h. bei Eingehen einer Bindung, diese Substanz für die pharmazeutische Anwendung genutzt wird. Selbstverständlich ist eine entsprechende Konfektionierung und die Beigabe üblicher Zuschlagsstoffe zur Herstellung des in den Verkehr gelangenden Pharmazeutikums in der üblichen Weise erforderlich.

5 Ausdrücklich klarzustellen bleibt, daß für die Herstellung von Antitumor-
arzneien unter Zuhilfenahme des Rezeptors im vorbeschriebenen Sinne nicht nur humane Antikörper in Frage kommen, sondern
auch Mausantikörper und/oder humanisierte Antikörper beliebiger
Spezies. Gleichermaßen gilt dies für Antikörperfragmente wie z. B.
Fab und $F(ab)_2$ und/oder Fab'-Fragmente, wie sie durch die proteoly-
tische Spaltung von Antikörpern erhalten werden. Hierzu zählen
10 weiterhin Einzelstrangantikörper und/oder tetramere und/oder dimere
Antikörperform und/oder bispezifische Antikörper.

Weiterhin ist bekannt, dass humane Tumorantigene, die in Mäusen
immunogen sind, zur Erzeugung monoklonaler Mausantikörpern
verwendet werden, und die in der Lage sind, das humane Antigen
15 spezifisch zu erkennen und deshalb geeignet sind, bei Menschen
therapeutisch verwendet zu werden.

Aufgabe der zugrundeliegenden Erfindung ist die Ermittlung der
Rezeptorstruktur sowie deren Verwendung. Allerdings ergibt sich das
20 Problem, dass die wiederholte Injektion von „fremden“ Antikörpern
bsp. Mausantikörpern in Menschen sowohl zu nachteiligen Hyper-
sensibilitätsreaktion sowie erhöhten Clearance-Rate der zirkulieren-
den Antikörpern führen, sodass die Antikörper ihre Zielstelle nicht
erreichen.

25 Aus diesen Gründen bedarf es eine Überprüfung der therapeutischen
Verwendbarkeit von Mausantikörpern. Dessen ungeachtet ist die
Verwendbarkeit im Zusammenhang mit diagnostischen Verfahren
uneingeschränkt. Auch besteht die Möglichkeit, humanisierte
30 Mausantikörper abzuleiten und zu therapeutischen Zwecken zu nut-
zen. Auch hier ist entscheidend, daß nicht nur die bereits vorliegen-

den Tumore sondern auch präkanzerogene Strukturen mit Hilfe dieser Diagnoseverfahren ermittelbar sind.

5

Neben dem vorbeschriebenen Rezeptor wird weiterhin Schutz beansprucht für einen spezifisch hieran bindenden Mausantikörper, dessen Struktur durch die Anlagen A, B definiert ist. Die für alle Antikörper identischen Regionen wurden nicht wiedergegeben; beansprucht und dargestellt wurden jene für den individuellen Antikörper charakteristischen Regionen.

10

Im Ergebnis erlaubt es der in seiner Struktur beschriebene Rezeptor, der als Isoform zu CFR-1 zu bezeichnen ist, eine Therapie und Diagnose nicht nur von Tumoren sondern auch präkanzerogene Strukturen. Darüber hinaus wird ein spezifischer hieran bindender Mausantikörper in seiner Struktur beschrieben.

15

20

Materialien und Methoden

Zellkultur und Antikörperreinigung

25

Für alle Untersuchungen wurde die bekannte Magenadenokarzinom-Zelllinie 23132 (Hensel et al. 1999, Int.J.Cancer 81:229-235) verwendet. Die Zellen wurden bis zu 80% Konfluenz in RPMI-1640 (PAA, Wien Österreich) ergänzt mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin (1% für beide) gezüchtet. Für die beschriebenen Untersuchungen

30

wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA getrennt und zweifach mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) vor Benutzung gewaschen.

Die menschliche Hybridomazelllinie 103/51 wurde gewonnen und gezüchtet wie beschrieben in Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532. Die Reinigung der IgM Antikörper wurde in der Weise vorgenommen wie anderweitig bereits beschrieben (Vollmers et al., 1998 Oncol.Rep. 5:549-552).

Präparation von Membranauszügen

Die Isolierung der Membranproteine aus Tumorzellen wurde in der Weise, wie sie durch Hensel et al. (Hensel et al., 1999, Int.J.Cancer 81:229-235) beschrieben wurde, unter Benutzung der Zelllinie 23132 durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die zusammenhängenden Tumorzellen zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst und zentrifugiert, und in einem hypotonischen Puffer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3mM MgCl₂) aufgelöst. Nach einer 15 Min. Inkubationszeit auf Eis und einer Ultraschallbehandlung für 5 Min., wurden die Kerne durch Zentrifugieren bei 10.000 g für eine Dauer von 10 Min. pelletiert. Das Supernatant wurde für 30 Min. bei 100.000 g in einem Swing-out rotor zentrifugiert und hierdurch die Membran pelletiert. Nachdem die Pellets mit dem hypotonischen Puffer gewaschen wurde, wurden sie in einen Membran Lysis Puffer (50 mM HEPES pH 7.4, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerol, and 1% Triton X-100) erneut aufgelöst. Ein Protease Inhibitor (Boehringer, Mannheim, Deutschland) wurde allen Lösungen zugeben.

Western blotting:

Die Auftrennung durch 10 %ige SDS-PAGE Gele und Western blotting der Proteine wurden unter Standardbedingungen, wie anderweitig beschrieben (Hensel et al., 1999, Int.J.Cancer 81:229-235),

durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die geblotteten Nitro-
zellulose -Membrane mit PBS blockiert, welches 2 % Magermilchpul-
ver enthielt, dem eine einstündigen Inkubation mit 10 µg/ml gerei-
nigtem Antikörper 103/51 folgte. Nach dreimaligem Waschen mit
5 PBS + 0,05% Tween-20 wurde der zweite Antikörper (Peroxidase
gekoppelte Hasen antihumane IgM Antikörper (Dianova, Hamburg,
Deutschland)) inkubiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe des Supersi-
gnal Chemilumineszenz kits von Pierce (KMF, St. Augustin,
Deutschland) nachgewiesen.

Reinigung des Antigen 103/51

Die Reinigung des Antigens wurde mit Säulenchromatographie unter
Verwendung einer Pharmazia (Freiburg, Deutschland) FPLC Einheit
durchgeführt. Für die Größenausschluß-Chromatographie wurde ei-
20 ne Pharmazia Superdex 200 (XK 16/60) Säule mit 5 mg des Mem-
branpräparates geladen und mit einem Puffer A betrieben (100 mM
Tris/Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 40mM NaCl, 1% Triton X-100). Dann
wurde das Eluat fraktioniert und durch Western blot Analyse auf Re-
aktionen mit Antikörpern 103/51 untersucht. Die positiven Fraktionen
25 wurden auf einer MonoQ (5/5 Säule) unter Verwendung des Puffers
A gegeben. Die gebundenen Proteine wurden mit Hilfe eines linearen
Gradienten unter Verwendung des Puffers B (100 mM Tris/ Cl, pH
7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% Triton X-100) ausgewa-
schen, fraktioniert und mit Coomassiegefärbtem SDS-PAGE and
30 Western blot Analyse untersucht. Die positiven Banden wurden aus
dem Gel getrennt und sequenziert oder zur Immunisierung von Mäu-
sen genutzt.

MALDI peptide Aufzeichnung

5 Die interessierenden Banden wurden herausgetrennt und in kleine Stücke von etwa 1mm x 1mm zerschnitten. Die Gelstücke wurden gewaschen, mit DTT reduziert, S-Alkyliert mit Iodoacetamid und In-Gel aufgelöst mit Trypsin (unmodifiziert, Sequenzgrad, Boehringer) wie anderweitig beschrieben (Shevchenko et al., 1996b Anal.Chem. 68:850-858). Nach 3 Stunden der Verdauung bei 37°C wurden 0.3 µl der Lösung entfernt und einer MALDI peptid Massenspektrometrie auf einem Bruker Reflex MALDI-TOF unterzogen, welches mit einer nachträglichen Extraktion (Brucker, Franzen, Bremen, Deutschland) ausgerüstet war. Die Dünnschichttechnik wurde zur Probenpräparierung angewendet (Jensen et al., 1996 Rapid.Commun.Mass.Spectrum 10:1371-1378). Die tryptischen Peptid-Massen wurden dazu verwendet, um nicht redundante Proteinsequenzdaten durch ein Peptid-Suchprogramm, das im Hause entwickelt wurde, zu suchen.

Klonen des CFR-1 Antisense-Vektor und Transfektion

RNA Isolierung, cDNA Synthese und PCR wurden wie beschrieben (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurde für die Amplifikation von PCR aus einem 897 bp Fragment aus einem Bereich von 802 bis 1699 Basenpaare folgende Primer benutzt: CFR-für 5' GCTTGGAGAAAGGCCTGGTGAA 3', CFR-Rev 5' TGGCACTTGCGGTACAGGACAG 3'. Die Amplifikation wurde mit folgendem Zyklusprofil durchgeführt: 95°C, 2 Min; nachfolgend 35 Zyklen bei 94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C 60 sec. und abschließend 72 °C, 4 min. Die Klonierung in den pCR- Skript Amp SK (+)

Vektor und das Sequenzieren der DNA wurde wie früher schon beschrieben (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) durchgeführt. Der Insert wurde in den pHook-2 Vektor (Invitrogen, Leek, Niederlande) subkloniert und das Klonen wurde erneut durch Sequenzierung überprüft.

Die Transfektion der Zelllinie 23132 mit pHook2-anti CFR-1 wurde mit einem Primefaktor Reagenz (PQLab, Erlangen, Germany) entsprechend dem Lieferantenhandbuch vervollständigt. In Kürze, dass Plasmid DNA wurde auf 10 µg/ml verdünnt und das Primefaktorreagenz im Verhältnis 1:10 einem serumfreien Wachstumsmedium beigegeben. Die verdünnte Plasmid DNA (450 µl), das verdünnte Primefaktorreagenz ergänzend (90 µl) und das serumfreie Wachstumsmedium (460 µl) wurden vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. 60 ml Zellkulturschalen (70% konfluent) wurden zweimal mit dem serumfreien Wachstumsmedium gewaschen und anschließend die Primefaktor/DNA-Mischung tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden inkubiert für 18 Stunden bei 37°C and 7% CO₂, anschließend wurde das serumfreie Wachstumsmedium ersetzt durch ein Wachstumsmedium mit 10% FCS und die Zellen wurden weitere 24 Stunden inkubiert, bevor die Expression der CFR-1 Struktur untersucht wurde.

Durchflusszytometrie

Die Zelllinie 23132 wurde von den Kulturplatten durch Trypsin /EDTA 48 Stunden nach der Transfektion abgelöst, gewaschen und anschließend auf Eis mit dem Antikörper 103/51 oder dem humanen Isotyp-kontrol Antikörper (Chromopure human IgM) für 15 min. inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit einem FITC-gekoppelte Hasen Anti-Human IgM Antikörper (Dianova) für 15 Min. auf Eis. Die Antikörper wurden optimal in der 0,01% Natriumazid PBS enthalten ver-

dünnt. Die Zellen wurden mit Durchflusszytometrie (FACScan; Becton Dickinson, USA) analysiert.

5

Glycosidaseassays

10

Abgelöste und gewaschene Zellen werden erneut in RPMI-1640, welches 10% FCS enthält, suspendiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert, anschließend gezählt und die Cytospins präpariert. Nach Lufttrocknung, Acetonfixierungen der Cytospins Präparate (10 Min), gewaschen, inkubiert mit 20 µU/ml O-Glycosidase oder 5 mU/ml N-Glycosidase (Boehringer) für 4 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die Objektträger gewaschen und immunhistochemisch gefärbt.

15

20

Für die Deglycosylation der Membran-Proteine wurden die Membranextrakte für 16 Stunden bei 37°C mit 1 mU/ml N-Glycosidase, verdünnt in Deglycosylation Puffer (50 mM POO-Buffer, pH 7,4) inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Extrakte mit Deglycosylation Puffer allein inkubiert. Dann wurden die Extrakte durch SDS-PAGE separiert und die Western blots, wie oben beschrieben, durchgeführt.

25

Herstellung murine monoklonaler Antikörper

30

BALB/cMäuse wurden zweimal innerhalb 17 Tage mit 5 µg gereinigten Antigen des Antikörpers 103/51 immunisiert, und 4 Tage nach der zweiten Immunisierung getötet. Die Milz wurde mechanisch entfernt und mit 1×10^7 NSO Zellen, wie früher schon beschrieben (Vollmers et al., 1985 Cell 40:547-557), verschmolzen. Die Antikörper produzierenden Hybridome wurden durch immunohistochemi-

sche Färbung und der Reaktion in der Western blot Analyse getestet. Der Klon 58/47-69 mit positiver Reaktion wurde für die weiteren Experimente genutzt.

5

Immunohistochemisches Färben der Paraffin Sektionen

10

In Paraffin eingebettete menschliche Magenschleimhaut mit Tumorzellen wurde zerkleinert (5µg), entparaffiniert, und blockiert mit BSA (15 mg/ml), welches in PBS verdünnt ist, für 30 Min. Die Sektionen wurden inkubiert mit dem Überstand der Hybridoma Zellen 103/51 oder 58/47-69, Ki 67 (Loxo, Dossenheim, Deutschland) oder Mausanti-cytokeration 8 Antikörper, verdünnt auf 1:15 mit BSA/PBS (Dako, Hamburg, Deutschland) für 2 Stunden in einem feuchten Inkubator. Anschließend wurden sie dreimal Tris/NaCl, gewaschen, gefolgt durch eine Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Hasen antihuman oder Hasen Antimaus-Konjugate (Dako), verdünnt auf 1:50 in PBS enthaltend ein Hasenserum (für den Antikörper 103/51) oder in PBS enthaltend menschliches AB Plasma (für Antikörper 58/47-69 und Anti-Cytokeratin). Nach dreimaligen Waschen mit Tris/NaCl und Inkubation in PBS für 10 Min. wurde das Färben mit Diaminobenzidine (0,05%)-Hydrogen Peroxyd (0.02%) für 10 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde unter laufendem Wasser gestoppt und die Sektionen wurden mit Hematoxylin gegengefärbt.

15

20

25

30

Immunohistochemisches Färben von lebenden und Aceton fixierten Zellen

Für das Färben lebender Zellen wurden die Zellen herausgelöst, ge-
 waschen und verdünnt auf 1×10^6 Zellen pro ml. 1 ml der Zelllösung
 werden bei 1.500 g für 5 Min. zentrifugiert. Der auf 40 µg/ml mit voll-
 ständigen RPMI verdünnte Antikörper wird zu einem Endvolumen
 5 von 1ml ergänzt und für 90 Min. auf Eis inkubiert. Dann werden die
 Zellen bei 1.500 g für 5 Min. pelletiert und wieder aufgelöst mit 500 µl
 RPMI. Mit 200 µl der Zelllösung werden die Zytospinpräparate präpa-
 riert und für 30 Min luftgetrocknet. Die Zellen werden in Aceton für 30
 10 Min. fixiert und dreimal mit Tris/NaCl gewaschen. Die HRP-
 gekoppelten Hasen antihumanen IgM (DAKO) werden 1:50 in
 PBS/BSA (01,%) verdünnt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inku-
 biert. Nach dreimaligem Waschen wird das Färben, wie oben er-
 wähnt, durchgeführt.
 Für das Färben der azeton-fixierten Zellen werden die Zytospins prä-
 15 pariert, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und, wie oben beschrie-
 ben, in Azeton fixiert. Dann werden die Zytospins für 15 Min. mit
 PBS/BSA (0,1%) blockiert und für 30 Min. mit 10 µg/ml primärer Anti-
 körper inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Die Inkubati-
 on mit den sekundären Antikörpern und das Färben wird, wie oben
 20 beschrieben, durchgeführt.

25

MTT-Proliferation Untersuchung

Die MTT- Untersuchung der bekannten Zelllinie 23132 wurde wie
 beschrieben (Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532) durchge-
 30 führt. Verkürzt wiedergeben wurden die trypsinisierten Zellen mit
 Wachstumsmedium auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt und eine 50 µl
 Zellsuspension wurde jeder Vertiefung eine 96-Loch Zellkulturplatte

zugegeben. Dann wurden 50 µl der Antikörper, verdünnt in den angegebenen Konzentrationen mit Wachstumsmedium, zu diesen Vertiefungen addiert und die Platten wurden für ein oder zwei Tage bei 37° C in einen feuchten Inkubator inkubiert. Zur Messung wurden 50 µl auf MTT (3(4,5 Dimethylthiazol)-2,5 Diphenyltetrazolium bromid) Lösung (5 mg/ml) in jede Vertiefung gegeben und die Platten wurden für 30 Min. inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten bei 800 g für 5 Min. zentrifugiert, die MTT Lösung entfernt und das gefärbte Zellpellet in 150 µl Dimethylsulphoxid auflöst und die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm und 690 nm gemessen.

Methoden zur Bestimmung der Sequenz von CFR-1

Die Präparation von RNA für die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits von Quiagen. Zur Vorbereitung wurden 1×10^6 Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1.000 x g für 5 min pelletiert und entsprechend der Herstellerbeschreibung die RNA präpariert. 5 µg RNA (1-5 µl Lösung) wurden mit 1 µl Oligo-dT₁₅ (1 µg/µl) und 2 µl random primer (40 µM) gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 8 µl mit H₂O aufgefüllt. Es erfolgte die Denaturierung der RNA für 10 min bei 65°C und anschließend die Abkühlung der Probe auf Eis. Zu dieser wurden dann 17 µl Mastermix, bestehend aus 5,2 µl DEPC-H₂O, 5 µl 5fach Reverse-Transkriptase-Puffer, 2,5 µl dNTPs (je 10 mM), 2,5 µl DTT (250 mM), 0,8 µl RNasin (400 U) und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U) pipettiert. Die Synthese der cDNA erfolgte für 70 min bei 37°C und wurde anschließend durch eine Erhitzung auf 95°C für 5 min abgebrochen. 1-5 µl der cDNA wurden mit dem PCR-Mastermix gemischt und auf 25 µl Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt. Der PCR-Mastermix besteht aus 2,5 µl 10fach Taq-Polymerase-Puffer, 0,5 µl 10 mM NTPs, 1,5 – 2 µl 25 mM MgCl₂, je 0,5 µl 20 pM 3' bzw. 5' Primer und 0,2 µl Taq-

Polymerase (1U). Die Amplifikationsbedingungen für die verschiedenen PCR-Produkte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Übersicht der zur Amplifikation der verschiedenen cDNAs verwendeten PCR-Programme

5

10

15

Produkt	Annealing in [°C]	MgCl ₂ [mM]	Extensionszeit [sec]	Zyklen	Produktgröße [bp]
Fragment 1	55	1,75	45	40	691
Fragment 2	60	1,5	45	40	898
CFR Fragment 3	55	2,0	45	40	739
Fragment 4	55	2,0	45	40	941
Fragment 5	55	2,0	45	40	750

Primer-Sequenzen

Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide

20

25

30

CFR

CFR-For 1	5'	OGC AGC TTC AGC AGC AAC AGC A	3'
CFR-Rev 1	5'	CAG CTC AGC CAC CCG GAG AAT G	3'
CFR-For 2	5'	GCT TGG AGA AAG GCC TGG TGA A	3'
CFR-Rev 2	5'	TGG CAC TTG CGG TAC AGG ACA G	3'
CFR-For 3	5'	GAA CAC CGT CTC TTA GAG CTG C	3'
CFR-Rev 3	5'	GCT TCC TGC AGA GTG TCA TTG C	3'
CFR-For 4	5'	GGA GGA CGT GTT GAA GCT TTG C	3'
CFR-Rev 4	5'	CCA GGG CAC AAG CAG TAT GAA G	3'
CFR-For 5	5'	CAA CAG CAG ACA GGT CAG GTG G	3'
CFR-Rev 5	5'	CCG GAA GTT CTG TTG GTA TGA G	3'

Die Sequenzierung erfolgte mit einem Sequenzierautomaten der Firma AppliedBiosystems. Für die Sequenzierung klonierter PCR-Produkte wurden die folgenden Oligos verwendet:

35

T₃ 5' ATT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'
 T₇ 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'

5 3 µl Plasmid-DNA, isoliert wie unter 2.4.15. beschrieben, wurden mit
 1 µl Primer (3,2 pM), 11 µl H₂O und 5 µl Reaktionsgemisch des Abi-
 Prism Sequencing Kits gemischt und im Thermocycler für 25 Zyklen
 mit den folgenden Parametern inkubiert:

	<u>Denaturierung</u>	<u>Annealing</u>	<u>Extension</u>
10	95°C, 30 sec	52°C, 15 sec	60°C, 4 min

15 Zum Entfernen von Oligos und dNTPs wurde das Reaktionsgemisch
 über eine Sephadex G-50 Säule gereinigt. Hierzu wurde eine 100 µl
 Pipettenspitze bis zum oberen Rand mit Säulenmaterial beladen und
 für 3 min bei 2.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe
 aufgegeben und das Säulchen nochmals zentrifugiert. Die DNA wur-
 de dann durch 2 µl Na-Azetat (pH 5,2) und 50 µl 100% Äthanol aus-
 gefällt und durch eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 min pelle-
 tiert. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 3 µl Formamid/25 mM
 20 EDTA (5:1) aufgenommen und im Sequenzierautomaten analysiert.

Auswertung der Sequenzierungen

25 Von allen Klonierungen wurden mindestens fünf Klone sequenziert.
 Um Fehler zu beseitigen, die bei der Amplifikation mit der Taq-
 Polymerase bzw. der Sequenzierung entstanden sind, wurden die
 Sequenzen der klonierten PCR-Fragmente mit Hilfe der DNAsis für
 Windows Software untereinander verglichen und eine Konsensus-
 30 Sequenz aller Klone aus beiden Leserichtungen erstellt. Durch Um-
 schreiben der DNA-Sequenzen in Aminosäure-Sequenzen wurde
 dann die Anzahl der stillen Mutationen und der Aminosäure-

austauschmutationen bestimmt. Die Sequenzen für MG160 und CFR wurden aus der NCBI-Datenbank bezogen und mit dem DNAsis für Windows Programm mit Sequenzierungen der PCR-Produkte verglichen.

5

Figuren und Tabellen

Figur 1: Identifizierung des Antigens des Antikörpers 103/51

a) Proteinreinigung des Antigens aus Membranextrakten der Magenkrebszelllinie 23132. Die Membranfraktionen werden chromatographisches Verfahren unterworfen und Ganzmembranfraktionen (Reihe 2) oder gereinigte Proteine (Reihe 3) werden mit Coomassie eingefärbt (Reihe 1 : 10 kDa Tabelle). Die Western Blot Analyse mit dem Antikörper 103/51 auf Membranfraktionen der Zelllinie 23132 angewendet zeigt eine Reaktion mit einem Protein mit Molekulargewicht von näherungsweise 130 kD (Reihe 4). Spezifitäten der gereinigten Membranextrakte wurde durch Westernblotting mit 103/51 kontrolliert (Reihe 5). Das durch einen Pfeil gekennzeichnete Protein wurde aus präparativem Gel gewonnen und für MALDI Massenspektrometrie und die Immunisierung von Mäusen genutzt.

20

b) Identifizierung der 130 kDa gelseparierten Proteine durch hochauflösende MALDI peptid Massenspektrometrie. Die mit „*“ bezeichneten Spitzen geben die berechneten Massen der tryptischen Peptide des U28811 humanen systemischen fibroblast growth factor receptor (CFR-1) mit einer Massengenauigkeit von mehr als 50 ppm wider. Die mit „T“ bezeichneten Spitzen entsprechen den Autolyseprodukten des Trypsin. Der Einschub zeigt eine Massenauflösung ($m/\Delta m = 9000$) der Spitzen bei m/z 1707.818.

25

30

Figur 2: Einfluß der CFR-1 Antisense-Transfektion auf Färbungen von Antikörpern 103/51 und Lebendzellfärbung (Vergrößerung 200x).

- 5 a) Die Zelllinie 23132 wurde mit Kontrollvektor vorübergehend transfiziert und die Azetonfixierung zeigt eine intensive Färbung mit Antikörper 103/51.
- b) Eine reduzierte Einfärbung von kurz mit CFR-1 Antisensevektor transfizierten Zellen ist sichtbar.
- 10 c) Um den Hintergrund im immunohistochemischen Färbungen zu verringern, wurden Lebendzelle der Zelllinie 23132 eingefärbt. Eine deutliche Membranfärbung ist sichtbar.
- d) Zur Kontrolle eine Lebendzellfärbung (nur sekundäre Antikörper) der Zelllinie 23132.
- 15 e) Das negative Lebendzellfärbung der Zelllinie Colo-699 mit dem Antikörper 103/51 zeigt, daß diese Zelllinie für CFR-1 negativ ist.
- f) Zur Kontrolle Lebendzellfärbung (nur sekundäre Antikörper) mit der Zelllinie Colo-699.
- g) Durchflußzytometrie mit der Zelllinie 23132 mit Antikörpern Chromopur human IgM (grau) und 103/51.
- 20 h) Analyse von Zellen, die mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 transfiziert sind, mit Durchflußzytometrie 48 Stunden nach der Transfektion.
- i) Zellen, die mit dem CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert sind, zeigen einen deutlichen Abfall in der Bindung des Antikörpers 103/51.
- 25

Figur 3: Einfluß der Deglycosylation auf die Färbung mit Antikörper 103/51

- 30 a) Zellen (23132) mit Deglycosylationspuffer inkubiert und Azeton fixiert zeigen eine intensive Färbung mit Antikörper 103/51.

b) Zellen (23132), die mit N-Glycosidase behandelt und anschließend Azeton fixiert wurden, zeigen eine deutliche Verringerung der Färbung.

5

c) Der Einfluß des Declycosylation auf Membranextrakte der Zelllinie 23132 in Reaktion mit dem Antikörper 103/51 in Westernblot-Analyse. Die für 16 Stunden mit Declycosylationspuffer (Puffer) inkubierten Extrakte zeigen keinen Unterschied im Färben im Vergleich zu unbehandelten Extrakten (Kontrolle). Die Inkubation mit N-Glycosydase führt zu einer deutlichen Verminderung im Färbung (N-Glyco).

10

Figur 4: Immunohistochemische Färbung mit murinen Antikörpern 58/47-69 und 103/51 auf Magenadenokarzinomen

15

Um identische Spezifität des Antikörpers 103/51 und des murinen Antikörpers 58/47-69 zu zeigen, wurde Magenadenokarzinomzellen vom diffusen Typ eingefärbt mit Hämatoxilin-Eosin (a), Antikörpern 103/51 (b) und 58/47-69 (c), und Antizytokeratin 18 als positive Kontrolle. Die identische Färbung in c und d zeigt identische Spezifität (Pfeile = Tumorzellen).

20

Figur 5: Immunhistochemische Färbung des Antikörper 103/51 auf verschiedenen Magengeweben

25

Cryosektionen von Magengeweben werden mit HE, Antikörper Ki67 (um die proliferierenden Zellen anzuzeigen) und Antikörper 103/51 gefärbt (Vergrößerung x100)

a) Magengewebe mit Entzündungen

b) H. pylori induzierte Gastritis (die Einschübe zeigen eine Vergrößerung der markierten Drüsen)

30

c) Dysplasi

d) Magenadenokarzinom

Figur 6: Immunhistochemisches Färbung mit Antikörper 103/51 auf verschiedenen kanzerogenen und normalen Geweben

5 Das Färben der Antikörper 103/51 wird bei folgenden Geweben gezeigt: Karzinom des Vater-Gefäßes (a), lobulär invasives Brustkarzinom (b), Adenokarzinom des Darmes und keine Färbung der normalen Becherzelle der Darmschleimhaut (c), Leberzellenkarzinom (d), glomeruläre und fasciculäre Bereiche der Nebennierenrinde (e),
10 Sammelgefäße der nierenspezifischen Färbung des Golgi-Apparates (Pfeil) (f). Die Pfeile in a - d zeigen Tumorzellen, der rote Pfeil in (c) = Becherzellen, der Pfeil in (f) deuten den Golgi-Apparat an (Vergrößerung 400x, mit Ausnahme (g) 200x).

15

Figur 7: Stimulation der Zelllinien mit Antikörpern 103/51 und 58/47-69 durch kolorimetrische MTT-Untersuchung bestimmt

a) Die Titration mit gereinigtem Antikörper 103/51 zeigt ein Anwachsen der Stimulation bis zu 4 µg/ml. Höhere Konzentrationen führen nicht zu einer höheren Stimulation (c = Control, keine Zugabe von Antikörper).

20 b) Eine MTT-Untersuchung mit gleichen Konzentration (4 µg/ml) von gereinigten Antikörpern 103/51 und 58/47-69 zeigen vergleichbare Stimulationen der Tumorzelllinien 23132 nach ein oder zwei Tagen Inkubation (Kontrolle 1 = Chrompur humanes IgM, Kontrolle 2 = unkorreliertes Maus IgM).

25 c) Die Zelllinie 23132 wurde vorübergehend mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 oder CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert, für 24 Stunden inkubiert und in einer MTT-Untersuchung nach Stimulation mit 4
30 µg/ml gereinigtem Antikörper 103/51 nach 24 Stunden getestet. Die nicht transfizierten Zellen wurden ebenso zur Kontrolle inkubiert (Kontrolle = nichtkorrelierter humaner IgM).

d) Eine MTT-Untersuchung mit gleichen Konzentrationen (4 µg/ml) des Antikörpers 103/51 auf unterschiedlichen Epithelialtumorzelllinien zeigen eine Stimulation nur der CFR-1 positiven Zelllinien 23132 24 Stunden nach Beigabe des Antikörpers. Die CFR-1 negativen Zelllinien Colo-699 und EPLC-272H zeigen keine Stimulation durch den Antikörper 103/51.

Tabelle 1: Reaktionsmuster des Antikörpers 103/51 mit verschiedenen Geweben

Die Färbung mit Antikörpern wurde wie folgt bewertet:

- = kein Färben, + = mäßiges Färben, ++ = intensives Färben. HCC = Hepatozellkarzinom (Leberzellkrebs), ¹ Proliferationsbereich, Drüsenvertiefung, ² Glomerular, Fascicularbereich (Membranfärben), ³ Sammelgefäße des retikulären Endothelgewebes.

Anlage A

Anlage B

Anlage S: Vergleich der Aminosäuresequenz der aus der Zelllinie 23132 gewonnenen CFR-1 mit den bereits veröffentlichten Sequenzen von CFR-1 und MG160.

Diese Vergleichsversuche beweisen zunächst, daß das aus der Zelllinie 23132 gewonnene CFR-1-Protein nicht identisch ist mit den vorbekannten CFR-1-Sequenzen sondern demgegenüber eine Isoform darstellt. Neben den Unterschieden gegenüber den vorbekannten und veröffentlichten CFR-1 und MG160 ist die Aminosäuresequenz einer speziellen Ausführungsform des allgemein beanspruchten Rezeptors abgesehen und von dem ersten und speziell gekennzeichneten Positionen eindeutig festgelegt.

RESULTATE

Reinigung und Identifizierung des Antigens 103/51

Die Western Blot Analyse wurde benutzt, um zu zeigen, daß der Antikörper 103/51 an ein etwa 130 kD Membranprotein auf einer Magenkrebszelle bindet. Die Vorreinigung dieses Proteins erfolgte durch sequenzielle Größenausschluß- und Anionenaustauschchromatographie (Fig. 1a). Das Protein wurde gewonnen aus einer Coomassie-gefärbten präparativen SDS-PAGE, ein Anteil hiervon wurde benutzt, um monoklonale Mausantikörper herzustellen (siehe unten) und der andere Teil wurde benutzt, um das Protein nach dem Verfahren, wie es Shevchenko et al. (1996 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93:14440:14445) beschrieben hat, zu identifizieren. Nach 3 Stunden in Geldigestieren mit Trypsin, wurden ca. 1% des insgesamt digestierten Volumens entfernt und einer hochgenauen MALDI peptid Massenspektrometrie (der Rest wurde für eine Nanoelektrosprayanalyse aufbewahrt, da eine MALDI MS nicht zu einer definierten Identifikation führte). Trotz des im Femtomolbereich liegenden Verbrauches des Proteindigestes für die MALDI-Analyse ergab die Untersuchung 35 Peptide der CFR-1 Sequenz mit einer Massengenauigkeit innerhalb von 50 ppm. Diese Peptide bilden 29% der CFR-1 Sequenz und identifizieren das Protein auf diese Weise das Protein, das ein errechnetes Molekulargewicht von etwa 134 kD hat (Burrus et al., 1992 Mol.Cell Biol. 12:5600-5609) (Fig. 1b).

Der Effekt der vorübergehenden Transfektion der Zelllinie 23132 mit dem CFR-Antisense-Vector auf die Färbung des Antikörpers 103/51 und Färbung von Lebendzellen

Wir untersuchten den Effekt der Antisensetransfektion der Magenkrebszelllinie 23132 unter Benutzung der Immunohistochemie und Durchflußzytometrie. Zu diesem Zweck wurde ein 897 bp PCR-

Fragment des CFR, aus dem Bereich der Basenpar 802 und 1699 entnommen, mit dem pHOOK-2-Vector im Antisensesinne im Bezug zum CMV promoter geklont. Die gewaschenen Zellen wurden in einen Zwischenschritt mit dem pHOOK-CFR Antisensevector pHOOK-lacZ und pHOOK Vektor transfiziert. Die Transfektion wurde durch eine β -Galatosidase Untersuchung (Daten nicht gezeigt) überprüft. 48 Stunden nach der Transfektion wurden Cytospins präpariert und mit Antikörpern 103/51 und Anti-Zytokeratin 18 zur Kontrolle gefärbt (Daten nicht gezeigt).

Die Immunohistochemie zeigt eine deutliche Reduzierung der Zellfärbung, die mit pHOOK-CFR Antisense Vektor transfiziert sind, im Vergleich mit Kontrollzellen (Fig. 2 a – b). Das bestätigt die Bindung des Antikörpers 103/51 an CFR-1. Das leichte zytoplasmatische Färben, das in beiden Färbeprozessen zu sehen war, kann seine Ursache in nichtspezifischen Bindungen haben, wie sie oft beim Färben von menschlichen IgM Antikörpern auf azetonfixierten Zellen beobachtet wird. Die Zellexpression als auch der Einfluß der Transfektion wurden durch Durchflußzytometrie überprüft (Fig. 2 g – i). Die Daten zeigen eine Reduzierung von Bindungen des Antikörpers 103/51 nach Transfektion von Zellen mit dem CFR-1 Antisense Vektor. Jedoch zeigen unbehandelte Zellen oder Zellen, die mit den Kontrollvektor pHOOK-2 transfiziert wurden, eine deutliche Bindung zur Zelllinie 23132, was die Expression von CFR-1 auf der Zellmembran zeigt.

Um die spezifische Membranverteilung der CFR-1 Isoform zu untersuchen, färbten wir lebende Zellen der Zelllinie 23132 und einiger Nichtmagenkrebszelllinien. Auf der Zelllinie 23132 ergab sich ein deutliches Färben (Fig. 2 c, d), während menschliche Lungenkarzinomzelllinien Colo-699 (Fig. 2 e, f) und EPLC-272H (Daten nicht gezeigt) eindeutig negativ waren. Diese Daten zeigen, daß die be-

schrieben CFR-1 Isoform nicht in allen Krebszelllinien vorhanden ist und ausschließlich das Einfärben der Membrane von 23132 Zellen zeigt, daß die CFR-1 Isoform eine Verteilung hat, die von der bislang für CFR-1 beschriebenen verschieden ist.

5

Glycosidaseassay

10

15

20

25

30

CFR-1 ist ein Sialoglycoprotein mit 5 möglichen N-Glycosylation-Armen und es wurde durch Behandlung mit Glycosidase F gezeigt, daß das Molekül an diesen Stellen glycosoliert (Steegmaier et al. Nature 373:615-620, 1995). Da tumorreaktive Antikörper oft mit Carbohydrat-Gruppen reagieren, haben wir untersucht, ob dies auch für den Antikörper 103/51 der Fall ist. Cytospinpräparationen der Zelllinie 23132 wurden für 4 Stunden mit O- und N-Glycosidase inkubiert und anschließend einem immunhistochemischen Färben mit dem Antikörper 103/51 unterworfen. Die Behandlung der Zelle mit N-Glycosidase führte zu einer dramatischen Verringerung in der 103/51 Färbung (Fig. 3 b), während die Inkubierung mit Dephosphorylation Puffer (Fig. 3 a) oder die Bearbeitung mit O-Glycosidase (Daten nicht gezeigt) keine Auswirkung auf die Bindung des Antikörpers 103/51 haben. Dies zeigt, daß die Bindungsspezifität des Antikörpers 103/51 in den Zuckerbestandteilen und nicht in den primären Proteinsequenzen lokalisiert sind. Zur weiteren Überprüfung dieses Effektes wurden die Membranextrakte der Zelllinie 23132 für 16 Stunden deglycosyliert und Western Blots durchgeführt und mit Antikörpern 103/51 gefärbt. Wir fanden eine Verringerung der Reaktion mit Lysaten, die mit N-Glycosidase inkubiert waren, im Vergleich zu den Kontrolllysaten (Fig. 3 c).

Herstellung muriner Antikörper und immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten des Magenkarzinoms

Da Antikörper gegen CFR-1 nicht käuflich erwerbbar sind, wurden Mäuse mit gereinigtem Protein, welches aus Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgewaschen wurde, für die Produktion monoklonaler Antikörper immunisiert um die Spezifität zu bestätigen und weiterhin die CFR-1 Expression zu charakterisieren. Milzzellen wurden durch Fusion mit Heteromyelomzellen NSO konserviert. 150 Klone wurden durch immunhistochemisches Färbungen getestet. Die positiven Klone wurden erneut geklont und das Klon 58/47-49 (IgM) wurde zur weiteren Charakterisierung genutzt. Um die Bindungseigenschaften des humanen Antikörpers 103/51 und des murinen Antikörpers 58/47-69 zu untersuchen, färbten wir die Paraffinschnitte von 15 verschiedenen Magenadenokarzinom- und einem Adenozellen. Identisches Färben der Drüsenzellen der normalen Epithelialgewebe und intensives Färben der Karzinomzellen wurde erhalten (Fig. 4). Verkürzt wiedergegeben wurden die ersten Karzinomgewebe (n = 2) mit beiden Antikörpern gefärbt. Bei Darmkarzinomzellen haben beide Antikörper 4 von 5 Fällen angefärbt, bei diffusen Karzinomgeweben wurden alle Fälle (n = 4) gefärbt und bei Zwischentypen waren 50% (n = 4) bei beiden Antikörpern positiv. Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Expressionsrate von CFR-1 in den meisten Fällen des Magenkarzinomgewebes. Das untersuchte Adenomagebe zeigte ein bestimmtes Färbemuster mit positiven Zellen, nur im Übergang von den normalen zu den transformierten Zellen.

25

Immunohistochemisches Färben mit Antikörper 103/51 auf Magenschleimhaut

Um die Reaktionen des Antikörpers 103/51 auf Magenschleimhaut näher zu untersuchen, haben wir ein immunohistochemische Färbungen von Magengewebe ohne Entzündung, durch H. pylori bedingte chronisch aktive Gastritis, hochgradige Dysplasie und Magenadenokarzinom durchgeführt. Bei dem nichtentzündeten Magenge-

30

webe wurden keine Reaktionen beobachtet (Fig. 5). Jedoch fanden wir in der Magenschleimhaut eines Patienten mit *H. pylori* Gastritis eine Einfärbung primär im Basalbereich der Foveolarzellen. Das Färbemuster des Antikörpers 103/51 zeigt einen strengen Zusammenhang mit dem Aktivierungsmuster, wie es sich beim Ki67-Färben zeigt (Ramires et al., 1997 J. Pathol 182:62-67). Eine intensivere Färbung des Antikörpers 103/51 konnte im Proliferationsbereich der Magendysplasi gesehen werden, das ebenso Übereinstimmung mit dem Ki67-Färbung zeigt. Die stärkste Färbung wurde in den Proliferationsbereich der Magenadenokarzinoma gefunden.

Immunohistochemisches Färben der Antikörper 103/51 und 58/47-69 auf verschiedenen Geweben

Wir untersuchten die Expression von CFR-1 in anderen kanzerogenen und normalen Geweben durch immunhistochemische Färbung auf Paraffinschnitten mit den Antikörpern 103/51 und 58/47-69. Bei 15 Krebsgeweben (verschiedener Magenkrebsarten) zeigte der Antikörper 103/51 ein Färben in 13 Fällen (Fig. 6, Tab. 1a). Ein negatives Ergebnis wurde bei den anaplastischen Zellen der Lunge beobachtet, was die Ergebnisse des immunhistochemische Färbung und der MTT-Untersuchung mit den Zelllinien Colo-699 und EPLC-272H bestätigt. Diese Daten zeigen eine starke Expression auf CFR-1 und eine Verteilung in den Zellmembranen der durch Geschwulste veränderten Zellen.

Bei den 28 untersuchten normalen Geweben wurde eine geringe Expression nur in 3 Darmproben gefunden (Tab. 1 b). Eine Färbung der Membrane wurde bei Foveoladrüsen des Magens und den glomerularen und fascicularen Bereiche der Drüsenzellen beobachtet, wohingegen ein Färben des Golgi-Apparates in den Sammelröhren der Niere gefunden wurde (Fig. 5). Dies bestätigt weiterhin die Charakte-

risierung des Antigens als CFR-1, wie es schon früher durch Burrus et al. (1992) Mol.Cell Biol. 12:5600-5609 beschrieben wurde.

5 Stimulierung mit humanen und murinen monoklonalen Antikörpern

Wie bereits in früheren Publikationen (Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532; Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) erläutert, führt der Antikörper 103/51 zu einer Stimulation der Zelllinie 23132 in vitro. Wir haben diese Stimulation des Antikörpers 103/51 durch Anwendung der Mitochondrialhydroxylaseuntersuchung (MTT) gemessen, welches eine Standarduntersuchung für Proliferation darstellt (Carmichael et al., 1987 Cancer Res. 47:936-942). Um weiterhin die Stimulationseigenschaften des Antikörpers 103/51 zu untersuchen, haben wir die Zelllinie 23132 mit verschiedenen Konzentrationen gereinigter Antikörper inkubiert. Wir fanden eine konzentrationsabhängige Stimulation mit höchster Aktivität bei 4 µg/ml (Fig. 7 a). Höhere Konzentrationen zeigten ein leichtes Abfallen in der Stimulation.

Um zu untersuchen, ob der murine Antikörper 58/47-69 den gleichen Einfluß auf das Zellwachstum hat, haben wir die MTT-Stimulationsuntersuchung mit gereinigten Antikörpern in vergleichbarer Menge durchgeführt. Wie aus Fig. 7 b entnommen werden kann, führten beide Antikörper zu einer Stimulation der Zelllinie 23132 in vitro. Dies bestätigt weiterhin die identische Spezifität beider Antikörper.

Um zu bestätigen, daß die Stimulation des Antikörpers 103/51 und des murinen Antikörpers 58/47-69 durch die Bindung an CFR-1 vermittelt wird, haben wir die Zellen mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 und dem CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert und die Zellen durch eine MTT-Untersuchung getestet. Als positive Kontrolle für die

Transfektion wurden die Zellen ebenso mit den pHOOK-2-lacZ Vektor transfiziert und danach mit β -Galactosidose eingefärbt (Daten nicht gezeigt). Da vergleichbare Stimulationen in den nichttransfektierten Fällen und den Zellen, die mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 transfiziert wurden, beobachtet werden konnte, kann eine Reduzierung des Stimulationseffektes durch den Transfektionsprozeß ausgeschlossen werden. Im Gegensatz hierzu zeigten die Zellen, die mit dem CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert wurden, eine verringernde Stimulation (Fig. 7 c).

Schließlich wurde, um zu zeigen, daß die Stimulation durch den Antikörper 103/51 nicht durch andere Rezeptoren als den CFR-1 vermittelt wurde, eine MTT-Stimulationsuntersuchung mit der Zelllinie 23132 vorgenommen und mit der CFR-1 negativen Lungenkarzinomzelllinien Colo-699 und EPLC-272H verglichen. Während die Zelllinie 23132, wie oben beschrieben, stimuliert wird, zeigten die beiden Lungenkarzinomzelllinien keine Stimulation durch den Antikörper 103/51 (Fig. 7 d), was die Resultate der Immunhistochemie bestätigt.

Patentansprüche

- 5 1. Rezeptor auf der Oberflächenmembran von stark proliferierenden Zellen insbesondere des Magenkarzinoms, der aus Glykoproteinen aufgebaut ist,
dadurch gekennzeichnet,
dass wenigstens eine Determinante des Glykoproteins mit einer des
10 CFR-1 Proteins übereinstimmt und
der humane Antikörper 103/51 und/oder der murine Antikörper
58/47-69 (IgM) am Glykoprotein spezifisch bindet.
- 15 2. Rezeptor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die
primäre Aminosäuresequenz des Glykoproteins zu mindestens 80 %
mit der des CFR-1 übereinstimmt (homolog ist).
- 20 3. Rezeptor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die De-
terminante des Glykoproteins die in Anlage S Zelllinie 23132 wieder-
gegebene Aminosäuresequenz aufweist.
- 25 4. Rezeptor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet
durch ein Molekulargewicht von etwa 130 kD.
- 30 5. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden An-
sprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass der Rezeptor zur Ausbil-
dung von Antikörpern in vivo verabreicht wird.

6. Verwendung des Rezeptors zur Bekämpfung von Tumoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Rezeptor vor (zur Prophylaxe) oder mit dem Ausbruch der Krankheit (zur Therapie) verabreicht wird.

5

7. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bekämpfung folgender Tumore: Speiseröhre, Magen, Darm, Rektum, Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Vater-Gefäß, Lunge, Bronchien und/oder Brust.

10

8. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche zu Diagnosezwecken, dadurch gekennzeichnet, dass über die Bindefähigkeit von Antikörpern an den Rezeptor ein Nachweis für die Existenz, die Lokalisierung und/oder die Menge der entsprechenden Antikörper bzw. Rezeptoren geführt wird.

15

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörper Tumorantikörper sind.

20

10. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Tumormarker ist.

25

11. Verfahren zur Gewinnung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

30

a) Präparieren von Membranproteinen von Zellen der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132

- b) Durchführen einer Größenausschlußchromatographie sowie
- c) einer Anionenaustauschchromatographie und
- d) schließlich Gewinnung durch eine präparative SDS-PAGE.

5

12. Muriner Mausantikörper 58/47-69 zur Verwendung in einem der vorhergehenden Ansprüche und einer Struktur, die durch folgende Merkmale gekennzeichnet ist:

10

Die variable Region der schweren Kette ist homolog zur IGHV 1S 125* 01 gemäß Anlage A, wobei das D-Segment homolog zu IGHD-ST 4*01 und das J-Segment homolog zur IGHJ4*01 ist, und die variable Region der leichten Kette eine Struktur gemäß Anlage B aufweist, die homolog zu IGKV- 17* 01 ist, wobei das J-Segment homolog ist zu IGKJ2*01.

15

13. Verfahren zur Herstellung eines Antitumormittels unter Verwendung von Rezeptoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

20

dass eine potentiell antitumorwirksame Substanz auf ihre spezifische Bindefähigkeit an Rezeptoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche überprüft und bei positiven Ergebnis diese Substanz für die pharmazeutische Anwendung konfektioniert und hierbei mit üblichen Zusatzstoffen versehen wird.

25

14. Verfahren zur Herstellung eines Antitumormittels unter Verwendung von Rezeptoren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Substanzen um humane Antikörper und/oder Mausantikörper und/oder humanisierte Mausantikörper und/oder Fab und F(ab)₂- und Fab'-Fragmente und/oder Einzelstrangantikörper

30

und/oder tetramere und/oder dimere Antikörperformen und/oder bispezifische Antikörper handelt.

Fig. 1

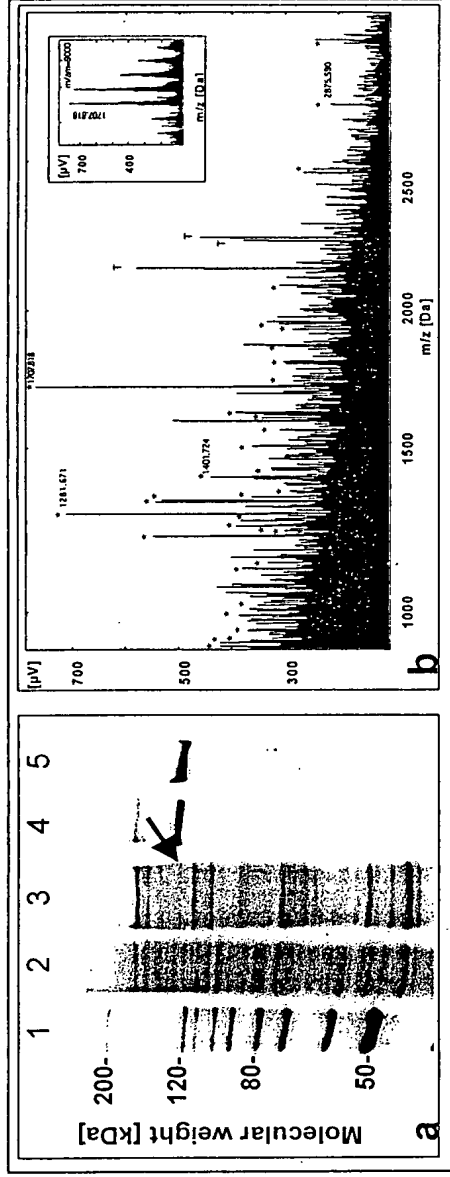


Fig. 3



Fig. 2

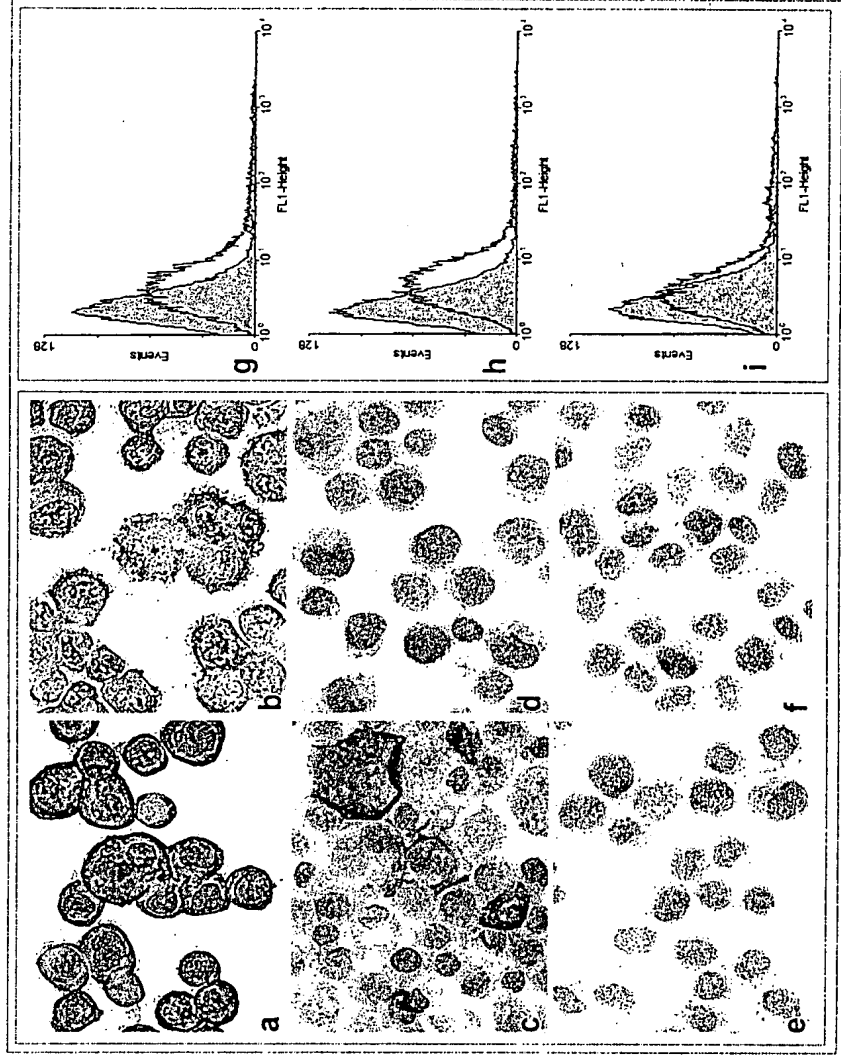


Fig. 4

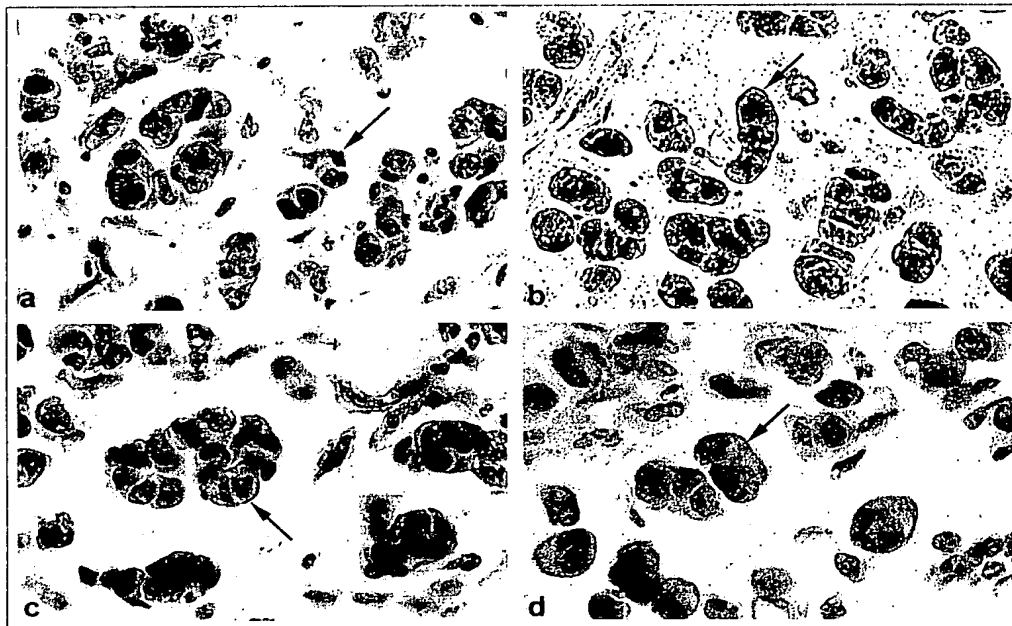


Fig. 5

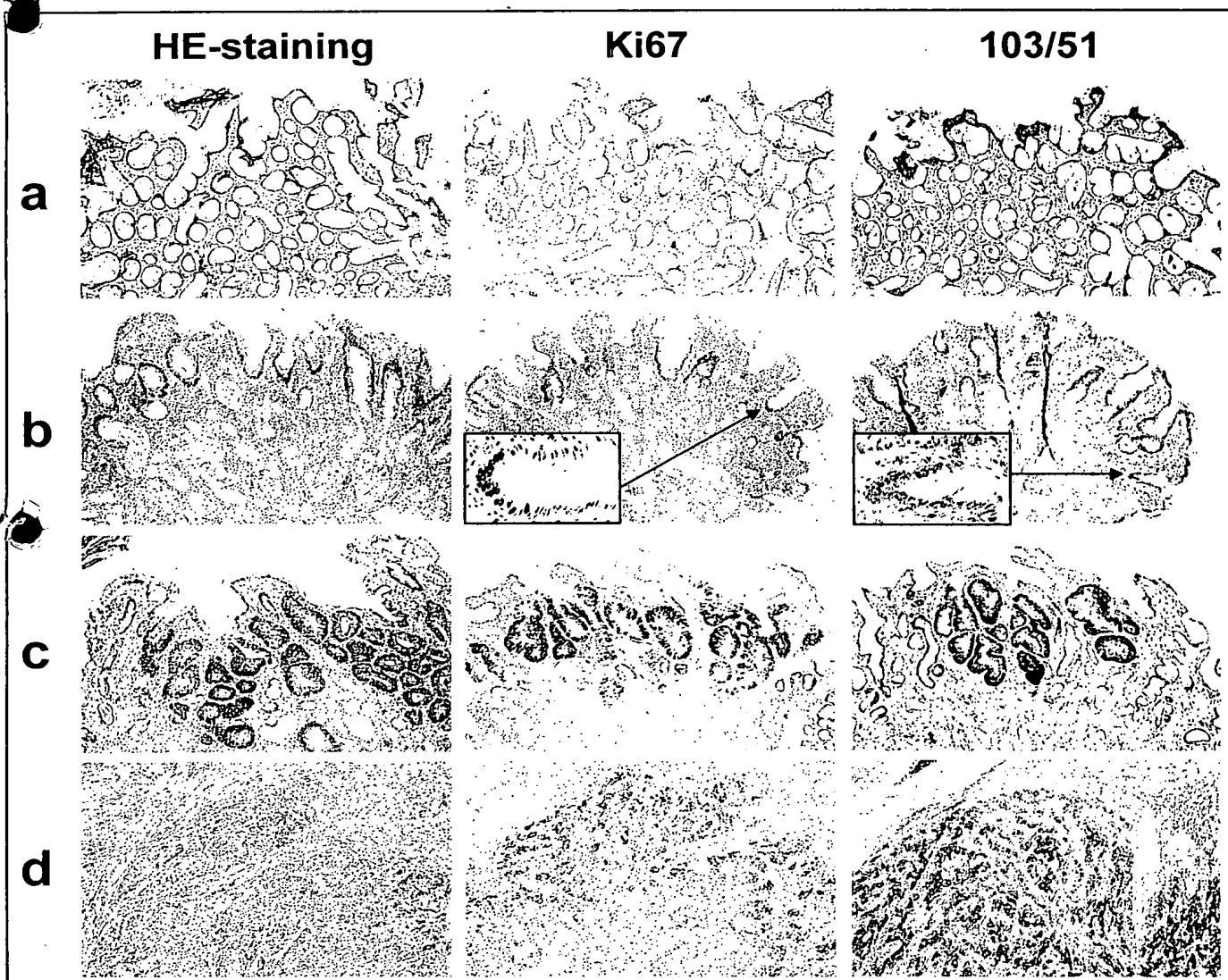


Fig. 6

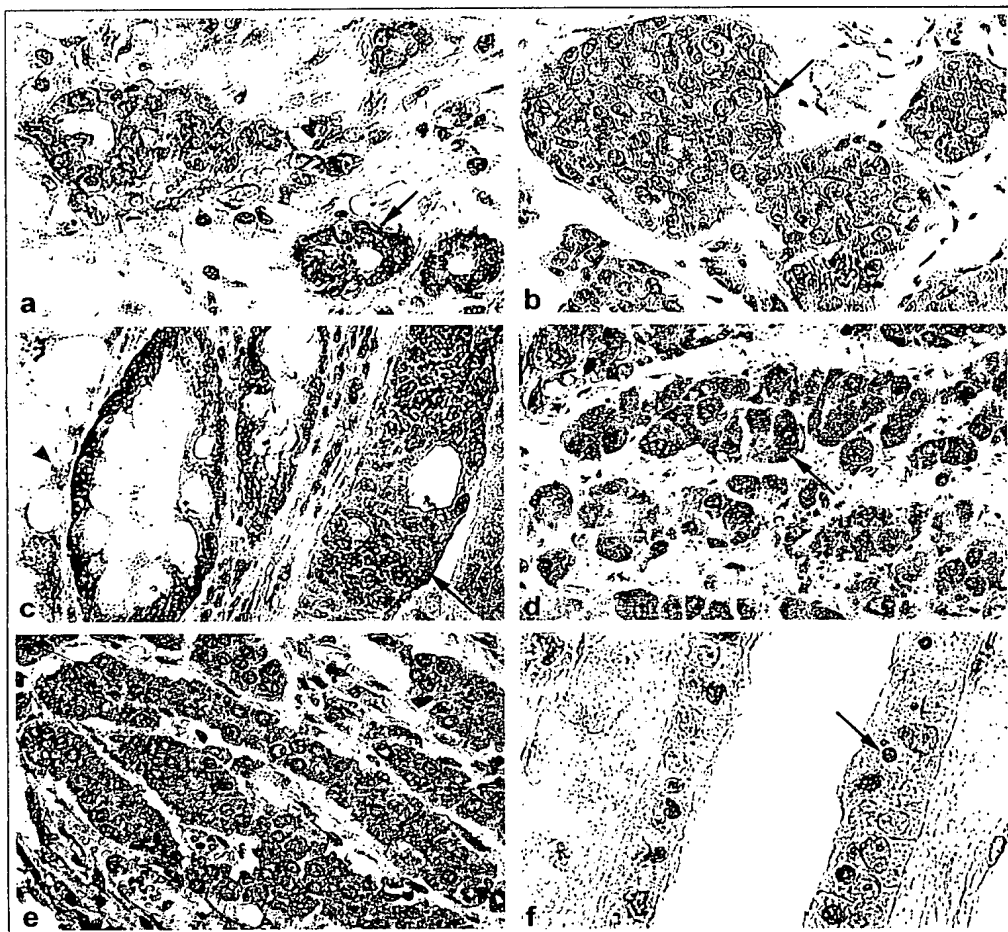


Fig. 7

